



Espacenet

**Bibliographic data: JP2004215567 (A) — 2004-08-05****MICROORGANISM BELONGING TO GENUS BACILLUS AND CONTROLLING AGENT USING THE SAME****Inventor(s):** KAWAMOTO YOSHIKATSU ±**Applicant(s):** KANSAI KK ±

**Classification:** **international:** *A01N63/00; A01N63/02; A01N65/00; A01N65/12; A01N65/20; A01N65/48; C12N1/20; C12N15/09; (IPC1-7): A01N63/00; A01N63/02; A01N65/00; C12N1/20; C12N15/09*

**- European:****Application number:** JP20030006366 20030114**Priority number(s):** JP20030006366 20030114**Also published as:** JP4189224 (B2)**Abstract of JP2004215567 (A)**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a microorganism having either property of the property of exhibiting antimicrobial activities against two or more plant pathogenic microbes, or the property of growing in the environment near to the growth environment of a plant such as a crop; and to provide a controlling agent capable of controlling diseases of the plant caused by two or more plant pathogenic microbes, an yeast of a fungus, an insect pest or the like. ; **SOLUTION:** The microorganism belonging to the genus Bacillus has an ability for suppressing the growth of the plant pathogenic disease. The controlling agent of an organism harmful to the plant contains at least one kind of the microorganism, a cultured product thereof and an extract thereof as an active ingredient. The method for controlling the harmful organism involves feeding at least one kind of the microorganism, the cultured product and the extract to a soil for growing the plant. The nucleic acid having a specific base sequence is also provided. ; **COPYRIGHT:** (C) 2004, JPO&NCIPI

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-215567

(P2004-215567A)

(43) 公開日 平成16年8月5日(2004.8.5)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 12 N 15/00</b>	C 12 N 15/00	Z NAA 4 B 024
<b>A 01 N 63/00</b>	A 01 N 63/00	F 4 B 065
<b>A 01 N 63/02</b>	A 01 N 63/02	E 4 H 011
<b>A 01 N 65/00</b>	A 01 N 65/00	A
<b>C 12 N 1/20</b>	A 01 N 65/00	C

審査請求 有 請求項の数 10 O L (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-6366 (P2003-6366)	(71) 出願人	503021674
(22) 出願日	平成15年1月14日 (2003.1.14)		株式会社カンサイ
			広島県広島市佐伯区五日市町大字石内46 ○番地
		(74) 代理人	100095832
			弁理士 細田 芳徳
		(72) 発明者	川本 義勝
			広島県広島市佐伯区五日市町大字石内46 ○番地 株式会社カンサイ内
		F ターム (参考)	4B024 AA07 CA02 4B065 AA15X AA58X AA60X AA62X AA66X AA68X AA69X AA72X AA73X AA80X AC20 BA22 CA47 4H011 AA01 AC01 AC06 BA07 BB21 BB22 DA13 DD04

(54) 【発明の名称】 バチルス属に属する微生物及びそれを用いる防除剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】複数又はそれ以上の植物病原菌に対する抗菌活性を発揮する性質、作物等の植物の生育環境に近い環境に生育する性質の少なくともいずれかの性質を有する微生物、複数又はそれ以上の植物病原菌、真菌の酵母、害虫等により引き起こされる植物の病害を防ぐことが可能な防除剤を提供すること。

【解決手段】植物病原菌の生育の抑制能を有する、バチルス (Bacillus) 属に属する微生物：該微生物、培養物及び抽出物の少なくとも1種を有効成分として含有した、植物に対する有害生物の防除剤：該微生物、培養物及び抽出物の少なくとも1種を、植物又は該植物を生育させるための土壌に供給することを特徴とする、有害生物の防除方法、並びに特定の塩基配列を有する核酸の提供。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

植物病原菌の生育の抑制能を有する、バチルス (Bacillus) 属に属する微生物。

## 【請求項2】

植物病原菌が、アスペルギルス フラバス リンク フリーズ エフ グレーバー (Aspergillus flavus Link Fries f. glaber)、アスペルギルス フラバス リンク フリーズバー、オリゼ (Aspergillus flavus Link Fries var. oryzae)、アスペルギルス ナイジヤー ファン ティーゲム (Aspergillus niger van Tieghem)、ムコル ヘマリス ヴェーマー エフ. ヘマリス (Mucor hiemalis Wehmer f. hiemalis)、ペニシリウム クリソケナム ソーム (Penicillium chrysogenum Thom)、リゾpus オリゼ ウェント アンド フリンセン ギーリングズ (Rhizopus oryzae Went & Prinsen Geerings)、カンジダ アルビカンス (ロビン) パークホント [Candida albicans (Robin) Berkman]、クリプトコッカス ネオフォーマンス (サンフェリス) ブィレミン [Cryptococcus neoformans (Sanfelice) Vuillemin]、ピキア メンブランファシエンス (イー. シー. ハンセン) イー. シー. ハンセン [Pichia membranifaciens (E. C. Hansen) E. C. Hansen]、サッカロマイセス セルビジエ マイヤー イーエクッス イー. シー. ハンセン [Saccharomyces cerevisiae Meyer ex E. C. Hansen]、リゾクトニア ソラニ ケーン 0-28株 (Rhizoctonia solani kuehn 0-28)、ロセリニア ネカトリクス (Rosellinia necatrix)、フサリウム オキシスラム エフ. スピーシーズ スプナシエ 0-27株 (Fusarium oxysporum f. sp. sp. aciae 0-27)、及びフサリウム オキシスラム エフ. スピーシーズ ラディシス-リコペルシチ 0-34株 (Fusarium oxysporum f. sp. Radicis-lycopersici 0-34) からなる群より選ばれた少なくとも1種の微生物である、請求項1記載のバチルス (Bacillus) 属に属する微生物。

10

20

30

## 【請求項3】

FERM P-19178、FERM P-19179及びFERM P-19180からなる群より選ばれた微生物である、請求項1又は2記載のバチルス (Bacillus) 属に属する微生物。

## 【請求項4】

下記a)～c) :

a) 請求項1～8いずれか1項に記載のバチルス (Bacillus) 属に属する微生物

b) 請求項1～8いずれか1項に記載のバチルス (Bacillus) 属に属する微生物の馴化培地、及び

c) 請求項1～8いずれか1項に記載のバチルス (Bacillus) 属に属する微生物の抽出物

40

からなる群より選ばれた少なくとも1種を有効成分として含有してなる、植物に対する有害生物の防除剤。

## 【請求項5】

キク科植物又はショウガ科植物由來の害虫忌避成分をさらに含有してなる、請求項4記載の防除剤。

## 【請求項6】

害虫忌避成分が、キク科植物の抽出物又はショウガ植物の抽出物である、請求項5記載の防除剤。

50

## 【請求項 7】

下記 a) ~ c) :

a) 請求項 1 ~ 8 いずれか 1 項に記載のバチルス (Bacillus) 属に属する微生物b) 請求項 1 ~ 8 いずれか 1 項に記載のバチルス (Bacillus) 属に属する微生物の培養物、及びc) 請求項 1 ~ 8 いずれか 1 項に記載のバチルス (Bacillus) 属に属する微生物の抽出物

からなる群より選ばれた少なくとも 1 種を、植物又は該植物を生育させるための土壤に供給することを特徴とする、有害生物の防除方法。

10

## 【請求項 8】

キク科植物又はショウガ科植物由来の害虫忌避成分を植物又は該植物を生育させるための土壤にさらに供給する、請求項 7 記載の有害生物の防除方法。

## 【請求項 9】

有害生物が、アスペルギルス フラバス リンク フリーズエフ グレーバー (Aspergillus flavus Link Fries f. glaber)、アスペルギルス フラバス リンク フリーズ バー オリセ (Aspergillus flavus Link Friesvar. oryzae)、アスペルギルス ナイジャーファン ティーケム (Aspergillus niger van Tieghem)、ムコルヘマリス ヴェーマー エフ ヘマリス (Mucor hiemalis Wehmer f. hiemalis)、ペニシリウム クリソケナム ソーム (Penicillium chrysogenum Thom)、リゾラス オリセ ウェント アンド フリンセン ギーリングズ (Rhizopus oryzae Went & Prinsen Geerlings)、カンジダ アルビカンス (ロビン) バークホント [Candida albicans (Robin) Berkhardt]、クリアトコッカス ネオフォーマンス (サンフェリス) プィレミン [Cryptococcus neoformans (Sanfeliice) Vuillemin]、ビキア メンブランニ ファシエンス (イー シー ハンセン) イー シー ハンセン [Pichia membranii faciens (E. C. Hansen) E. C. Hansen]、サッカロマイセス セルビジエ マイヤー イーエクッス イー シー ハンセン [Saccharomyces cerevisiae Meyer ex E. C. Hansen]、リゾクトニア ソラニ ケーン O-28 株 (Rhizoctonia solani Kuehn O-28)、ロセリニア ネカトリクス (Rosellinia necatrix)、フサリウム オキシスフラム エフ スピーシーズ スフナシエ O-27 株 (Fusarium oxysporum f. sp. sp. aciae O-27)、フサリウム オキシスフラム エフ スピーシーズ ラディシスライコペルシチ O-84 株 (Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici O-84)、エンドウヒゲナガアフラムシ及びコナガからなる群より選ばれた少なくとも 1 種である、請求項 7 又は 8 記載の有害生物の防除方法。

80

40

## 【請求項 10】

配列番号：1 ~ 8 いずれかに示される塩基配列を有する核酸。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、有害生物、特に、植物病原菌の生育の抑制能を有する微生物、該微生物を用いた防除剤等に関する。さらに詳しくは、本発明は、有害生物、特に、植物病原菌の生育を抑制する物質を产生する微生物、植物病原菌の生育を抑制すること及び/又は害虫を忌避することができる防除剤に関する。

## 【0002】

50

## 【従来の技術】

近代農業、特に、大規模な生産を目的とする農業においては、虫食いや病変部等がない見えるよい作物を得、かつ高収量を達成するために、化学合成農薬が使用されている場合があり、作物への該化学合成農薬の残留、該化学合成農薬による土壌、水等の環境の汚染等が懸念されている。そのため、いわゆる無農薬野菜、減農薬野菜等に注目が集まっている。

## 【0008】

しかしながら、無農薬栽培には、手間がかかること、病害虫による被害を被りやすく、そのため、収量も減ること等の欠点があり、無農薬栽培を行なっている農家は、全体の数%にとどまっている。したがって、実質的に必要となる手間を減らす観点から、ほとんど化学合成農薬に頼っているのが現状である。

10

## 【0004】

一方、化学合成農薬の代わりに、微生物を用いて、タバコ立枯病の病原菌、ナス科植物青枯病の病原菌、芝草病原菌、病原性糸状菌等の生育の抑制が試みられている。

## 【0005】

具体的には、エンテロバクター属に属する微生物、例えば、タバコ根部から分離されたエンテロバクター クロアカエ H184株 (Enterobacter cloacae H184) (FERM BP-5057) の培養物は、タバコ植物の根部やナス科植物の根部に注することにより、タバコ立枯病の病原菌、ナス科植物青枯病の病原菌等の防除に用いられることが知られている（特許文献1、特許文献2）。しかしながら、前記特許文献1及び特許文献2に記載のエンテロバクター属に属する微生物は、青枯病菌に対する抗作用を示すにすぎず、他の病原菌に対する抗作用を有するかどうかは不明である。

20

## 【0006】

また、ストレアトミセス アルプラスは、スクレロティニア属、リゾクトニア属、ビシウム属、カーブラリア属、ゴイマイノマイセス属、コレットリカム属等に抗性を有しており、植物病原菌防除材等に利用されることが知られている（特許文献3）。しかしながら、前記特許文献3に記載の植物病原菌防除材等は、芝草における病害に適用するためのものであり、他の植物に対する病原菌に適用できるかどうかは不明である。

## 【0007】

30

さらに、バチルス属に属し、かつアフラトキシン分解性を有する微生物、具体的には、アフラトキシン分解性を有するバチルス サブチルス DB9011株、及びバチルス プルミルスに属し、かつアフラトキシン分解性を有する微生物は、アフラトキシン生成能を有する真菌、特に、病原性糸状菌に対する発育抑制剤として使用されることが知られている（特許文献4、特許文献5）。特許文献4及び特許文献5に記載の発育抑制剤は、真菌、ながらも、アフラトキシン生成能を有する真菌、特に、病原性糸状菌の発育を抑制するものである。

## 【0008】

【特許文献1】特開平9-87775号公報 段落番号0010、表8及び表4

【特許文献2】特開平10-189610号公報 表5

40

【特許文献3】特開平8-242846号公報 段落番号0042、0049

【特許文献4】特開平5-146289号公報 段落番号0046～0052

【特許文献5】特開平5-268945号公報 段落番号0048～0050

## 【0009】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、有害生物、特に、植物病原菌、真菌の酵母の生育を抑制する性質、広範囲の植物病原菌、例えば、複数又はそれ以上の植物病原菌に対する抗菌活性を発揮する性質、作物等の植物の生育環境に近い環境に生育する性質の少なくともいずれかの性質を有する微生物を提供することを目的とする。さらに、本発明は、広範囲、例えば、複数又はそれ以上の有害生物、具体的には、植物病原菌、真菌の酵母、害虫等により引き起こされる植物

50

の病害を防ぐことが可能な防除剤を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明の要旨は、

〔1〕 植物病原菌の生育の抑制能を有する、バチルス (Bacillus) 属に属する微生物、

〔2〕 植物病原菌が、アスペルギルス フラバス リンク フリーズ エフ グレーバー- (Aspergillus flavus Link Fries f. glaber)、アスペルギルス フラバス リンク フリーズ バー. オリゼ (Aspergillus flavus Link Fries var. oryzae)、アスペルギルス ナイジャー フアン ティーケム (Aspergillus niger van Tieghem)、ムコル ヘマリス ヴェーマー エフ. ヘマリス (Mucor hiemalis Wehmer f. hiemalis)、ペニシリウム クリソケナム ゾーム (Penicillium chrysogenum Thom)、リゾラス オリゼ ウェント アンド プリンセン ギーリングズ (Rhizopus oryzae Went & Prinsen Geerings)、カンジダ アルビカンス (ロビン) バークホント [Candida albicans (Robin) Berkman]、クリアトコッカス ネオフォーマンス (サンフェリス) フィレミン [Cryptococcus neoformans (Sanfelice) Vuillemin]、ピキア メンブランニ ファシエンス (イー. シー. ハンセン) イー. シー. ハンセン [Pichia membranii faciens (E. C. Hansen) E. C. Hansen]、サッカロマイセス セルビジエ マイヤー イーエクッス イー. シー. ハンセン [Saccharomyces cerevisiae Meyere (E. C. Hansen)]、リゾクトニア ソラニ ケーン 0-28 株 (Rhizoctonia solani Kuehn 0-28)、ロセリニア ネカトリクス (Rosellinia necatrix)、フサリウム オキシスラム エフ. スピーズ スナシエ 0-27 株 (Fusarium oxysporum f. SP. SPnaciae 0-27)、及びフサリウム オキシスラム エフ. スピーズ ラディシス-ライコペルシチ 0-84 株 (Fusarium oxysporum f. SP. Radiciis-lycopersici 0-84) からなる群より選ばれた少なくとも 1 種の微生物である、前記〔1〕記載のバチルス (Bacillus) 属に属する微生物、

〔3〕 FERM P-19178、FERM P-19179 及び FERM P-19180 からなる群より選ばれた微生物である、前記〔1〕又は〔2〕記載のバチルス (Bacillus) 属に属する微生物、

〔4〕 下記a)～c) :

a) 前記〔1〕～〔8〕いずれか 1 項に記載のバチルス (Bacillus) 属に属する微生物、

b) 前記〔1〕～〔8〕いずれか 1 項に記載のバチルス (Bacillus) 属に属する微生物の馴化培地、及び

c) 前記〔1〕～〔8〕いずれか 1 項に記載のバチルス (Bacillus) 属に属する微生物の抽出物

からなる群より選ばれた少なくとも 1 種を有効成分として含有してなる、植物に対する有害生物の防除剤、

〔5〕 キク科植物又はショウガ科植物由来の害虫忌避成分をさらに含有してなる、前記〔4〕記載の防除剤、

〔6〕 害虫忌避成分が、キク科植物の抽出物又はショウガ植物の抽出物である、前記〔5〕記載の防除剤、

〔7〕 下記a)～c) :

a) 前記〔1〕～〔8〕いずれか 1 項に記載のバチルス (Bacillus) 属に属する

10

20

30

40

50

微生物、

b) 前記〔1〕～〔8〕いずれか1項に記載のバチルス (Bacillus) 属に属する微生物の培養物、及び

c) 前記〔1〕～〔8〕いずれか1項に記載のバチルス (Bacillus) 属に属する微生物の抽出物

からなる群より選ばれた少なくとも1種を、植物又は該植物を生育させるための土壤に供給することを特徴とする、有害生物の防除方法、

〔8〕 キク科植物又はショウガ科植物由来の害虫忌避成分を植物又は該植物を生育させるための土壤にさらに供給する、前記〔7〕記載の有害生物の防除方法、

〔9〕 有害生物が、アスペルギルス フラバス リンク フリーズ エフ グレーバー 10  
(Aspergillus flavus Link Fries f. laber)、

アスペルギルス フラバス リンク フリーズ バー、オリセ (Aspergillus flavus Link Fries var. oryzae)、アスペルギルス ナ

イジャー ファン ティーケム (Aspergillus niger van Tie  
ghem)、ムコル ヘマリスウェーマー エフ. ヘマリス (Mucor hiemal  
is Wehmer f. hiemalis)、ペニシリウム クリソケナム ソーム (Penicillium chrysogenum Thom)、リゾpus オリセ ウェ  
ント アンド フリンセン キーリングズ (Rhizopus oryzae Went  
& Prinsen Geerings)、カンジダ アルビカンス (ロビン) バー  
クホント [Candida albicans (Robin) Berkhardt]、

クリプトコッカス ネオフォーマンス (サンフェリス) フィレミン [Cryptococcus neoformans (Sanfeliice) Vuillemin]、

ピキア メンブランニ ファシエンス (イー. シー. ハンセン) イー. シー. ハンセン  
[Pichia membranii faciens (E. C. Hansen) E.

C. Hansen]、サッカロマイセス セルビジエ マイヤー イーエクッス イー.  
シ. ハンセン [Saccharomyces cerevisiae Meyer e  
x E. C. Hansen]、リゾクトニア ソラニ ケーン O-28 株 (Rhizoctonia solanii kuehn O-28)、ロセリニアネカトリクス (Rosellinia necatrix)、フサリウム オキシスプラム エフ. スピーシ  
ーズ スアナシエ O-27 株 (Fusarium oxysporum f. sp. sp  
naciæ O-27)、フサリウムオキシスプラム エフ. スピーシーズ ラティシ  
ス-ライコペルシチ O-84 株 (Fusarium oxysporum f. sp. R  
adicis-lycopersici O-84)、エンドウヒゲナガアブラムシ及び  
コナガからなる群より選ばれた少なくとも1種である、前記〔7〕又は〔8〕記載の有害  
生物の防除方法、並びに

〔10〕 配列番号：1 ～ 8 いずれかに示される塩基配列を有する核酸、  
に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明の微生物は、肥料から、本発明者らにより単離された微生物であり、植物病原菌の生育の抑制能を有するバチルス (Bacillus) 属に属する微生物である。

【0012】

本発明の微生物は、植物病原菌の生育の抑制能を有するという優れた性質を有する。したがって、本発明の微生物によれば、植物病原菌を防除することができるという優れた効果を発揮する。また、本発明の微生物によれば、植物病原菌の生育を抑制し、土壤病害を生じにくい土壤に改良することができるという優れた効果を発揮する。さらに、本発明の微生物は、広範囲の植物病原菌、例えば、複数又はそれ以上の植物病原菌に対する抗菌活性を発揮するという優れた性質を有する。したがって、本発明の微生物によれば、種々の土壤病害を防除することができるという優れた効果を発揮する。また、本発明の微生物は、植物の栽培時に通常用いられる肥料中から単離された微生物であり、作物等の植物の生育

10

20

30

40

50

環境に近い環境に生育する性質を有する。したがって、本発明の微生物によれば、植物の生育等に及ぼす負の影響（例えば、生育阻害等）が実質的でないという優れた効果を發揮する。

【0018】

本発明の微生物は、下記微生物学的性質：

- (1) 菌
- (2) 細胞の大きさ：0.7～1.0  $\mu\text{m}$  × 0.8～2.0  $\mu\text{m}$
- (3) 多形性：無
- (4) 運動性：有（周毛）
- (5) 孢子の有無：有（中央）
- (6) グラム染色：陽性
- (7) MRテスト：陽性
- (8) インドール産生：無
- (9) クエン酸の利用：koSekr陰性、Christensen陽性
- (10) 無機窒素源資化性：硝酸塩を資化するが、アンモニウム塩は資化しない
- (11) ウレアーゼ活性：無
- (12) オキシダーゼ活性：無
- (13) カタラーゼ活性：有
- (14) 生育の範囲PH：4.0～8.5
- (15) 生育の範囲温度：30～50°C
- (16) 好気性
- (17) O-Fテスト：陰性

を有する。本発明の微生物としては、具体的には、バチルススピーシーズ (*Bacillus* sp.) A-3、バチルススピーシーズ A-7 及びバチルススピーシーズ A-19 にさらに分類される。なお、本発明の微生物のさらに詳細な微生物学的性質を、後述の実施例の表1～表4に示す。

【0014】

本発明の微生物であるバチルススピーシーズ A-3 は、16S rDNA が、配列番号：1 に示される塩基配列を含むものであり、バチルススピーシーズ A-7 は、16S rDNA が、配列番号：2 に示される塩基配列を含むものであり、バチルススピーシーズ A-19 は、16S rDNA が、配列番号：8 に示される塩基配列を含むものである。

30

【0015】

なお、本発明の微生物は、*Bacillus* sp. A-3、*Bacillus* sp. A-7 及び *Bacillus* sp. A-19 と命名・表示され、それぞれ、FERM P-19178、FERM P-19179 及び FERM P-19180 として、寄託日：2002年12月26日、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター [日本国茨城県つくば市東1-1-1 中央第6 (郵便番号 305-8566)] に寄託されている。

【0016】

本発明の微生物により生育を抑制する対象となる植物病原菌は、植物に感染し、病害を引き起こす細菌であり、具体的には、例えば、ほうれん草株腐病の病原菌として知られているリゾクトニア ソラニ ケーン [*Rhizoctonia solani* kuehn (例えば、O-28株等)]、ほうれん草萎凋病の病原菌として知られているフサリウム オキシスボラム エフ.スピーシーズスピナシエ O-27株 (*Fusarium oxyphrum* f. sp. *spnaciae* O-27)、果樹紋羽病の病原菌として知られているロセリニア ネカトリクス (*Roseilinia necatrix*)、トマト根腐萎凋病の病原菌として知られているフサリウム オキシスボラム エフ.スピーシーズ ラディシス-ライコペルシチ O-84株 (*Fusarium oxyphrum* f. sp. *radicis-lycopersici* O-84)、さらには、ア

40

50

スペルギルス フラバス リンク フリーズ エフ グレーバー (Aspergillus flavus Link Fries f. glaber)、アスペルギルス フラバス リンク フリーズ バー、オリゼ (Aspergillus flavus Link Fries var. oryzae)、アスペルギルス ナイジャー フアンティーケム (Aspergillus niger van Tieghem)、ムコルヘマリス ヴェーマー エフ. ヘマリス (Mucor hiemalis Wehmeyer f. hiemalis)、ペニシリウム クリソケナム ゾーム (Penicillium chrysogenum Thom)、リゾpus オリゼ ウェント アンド プリンセン ギーリングズ (Rhizopus oryzae Went & Prinsen Geerings)、カンジダ アルビカンス (ロビン) バークホント [Candida albicans (Robin) Berkhardt]、クリプトコッカス ネオフォーマンス (サンフェリス) プィレミン [Cryptococcus neoformans (Sanfeliice) Vuillemin]、ピキア メンブランニ ファシエンス (イー. シー. ハンセン) イー. シー. ハンセン [Pichia membranii faciens (E. C. Hansen) E. C. Hansen]、サッカロマイセス セルビジエ マイヤー イーエクッス イー. シー. ハンセン [Saccharomyces cerevisiae Meyer ex E. C. Hansen] 等が挙げられる。

## 【0017】

本発明の微生物の生育範囲温度は、具体的には、バチルス スピーシーズ A-8については、25~45℃であり、好ましくは、37~40℃であり、バチルス スピーシーズ A-7については、25~45℃であり、好ましくは、37~40℃であり、バチルス スピーシーズ A-19については、25~50℃である。

## 【0018】

また、本発明の微生物の生育範囲PHは、具体的には、バチルス スピーシーズ A-8については、PH4~10であり、好ましくは、4~7であり、バチルス スピーシーズ A-7については、PH4~10であり、好ましくは、PH4~8であり、バチルス スピーシーズ A-19については、4~8、好ましくは、4~7である。

## 【0019】

本発明の微生物の培養に用いられる培地としては、前記生育範囲PHであり、かつ前記窒素源、炭素源、補助成分等を含有する培地であればよい。前記培地としては、具体的には、例えば、ポテトデキストロース培地 [ニッスイ社製、カタログ番号05709、培地1リットルあたりの組成：ポテト抽出液末 4.0g、ブドウ糖 20g、寒天 15g (PH6.0)]、Nutrient Broth [オキソイド (Oxoid) 社製、カタログ番号250427、培地1リットルあたりの組成：Lab-Lemco Powder (商品名) 1g、ペプトン 5g、酵母エキス 2g、塩化ナトリウム 5g、寒天 15g (PH6.0)] 等が挙げられる。なお、前記培地、例えば、前記ポテトデキストロース培地及びNutrient Brothを液体培地として用いる場合、寒天を含まない組成とすればよい。

## 【0020】

本発明の微生物による植物病原菌の生育の抑制能は、例えば、植物病原菌を播種した固体培地上に、本発明の微生物の培養物を供し、阻止円の形成の有無、阻止円の大きさを観察する評価方法により、評価されうる。前記固体培地としては、例えば、前記ポテトデキストロース培地等が挙げられ、好ましくは、植物病原菌の生育及び本発明の微生物の生育が良好であり、かつ阻止円の形成が確認可能な培地であることが望ましい。

## 【0021】

なお、本発明の微生物による前記植物病原菌の生育の抑制能の発現は、培養条件、具体的には、培養温度、培養PH、培養時間、培養時ににおける振度等について至適化することにより、最適化されうる。かかる培養条件の至適化は、種々の培養条件下に培養して得られた各種培養物について、前記評価方法により、阻止円の大きさを評価することにより容

10

80

40

50

易に行なわれうる。

【0022】

本発明の微生物は、肥料、コンポスト化過程にある堆積物を滅菌水等に懸濁し、ついで、得られた懸濁液を前記培地に塗布して、培養し、得られたコロニーについて、前記植物病原菌の生育を抑制すること、後述の実施例の表1～表4に示される微生物学的性質等を指標として単離して、得ることができる。

【0023】

本発明の微生物によれば、前記したように、植物病原菌の生育を抑制することができるため、本発明の微生物、その馴化培地又はその抽出物を有害生物等に対する防除剤として用いることができる。したがって、本発明により、防除剤が提供されうる。

10

【0024】

本発明の防除剤は、下記a)～c)：

- a) 前記バチルス (Bacillus) 属に属する微生物、
- b) 前記バチルス (Bacillus) 属に属する微生物の馴化培地、及び
- c) 前記バチルス (Bacillus) 属に属する微生物の抽出物

からなる群より選ばれた少なくとも1種を有効成分として含有する。したがって、本発明の防除剤によれば、土壌等への供給、肥料等への供給、植物の根部への供給、種子への供給等の簡便な手法により、有害生物により引き起こされる植物の病害等を防ぐことができるという優れた効果を発揮する。また、本発明の防除剤によれば、土壌に供給することにより、植物病原菌の生育を抑制し、それにより、土壌病害を生じにくい土壌に改良することができるという優れた効果を発揮する。

20

【0025】

本発明の防除剤は、キク科植物又はショウガ科植物由来の害虫忌避成分をさらに含有してもよい。

【0026】

本発明の防除剤によれば、広範囲の植物病原菌、例えば、複数又はそれ以上の植物病原菌に対して抗菌活性を発揮し、かつ害虫を忌避することができます。したがって、本発明の防除剤は、種々の土壌病害を防除することができるという優れた効果を発揮する。

【0027】

本発明の防除剤により防除されうる有害生物としては、前記植物病原菌等の微生物；コナガ [Plutella xylostella (Linnaeus)]、エンドウヒゲナガアブラムシ [Acyrthosiphon pisum (Harris)] 等が挙げられる。

30

【0028】

前記「供給」としては、散布、混合、塗布、浸漬等が挙げられる。

【0029】

本明細書においては、前記a)の「微生物」とは、培養後得られた培養液又は微生物細胞自体をいう。前記a)の微生物は、本発明の微生物を、前述の適切な培地で、適切な培養条件下に培養することにより得られる。

【0030】

本明細書においては、前記b)の「馴化培地」とは、培養後の培養液から、微生物細胞を除去して得られた培養産物をいう。前記b)の馴化培地は、例えば、過、遠心分離等により、培養液から、微生物細胞を除去することにより得られる。

40

【0031】

本明細書においては、前記c)の「抽出物」とは、前記a)の微生物又は前記b)の馴化培地から抽出された産物をいう。前記c)の抽出物は、例えば、

(I) 前記微生物細胞を、リゾチーム等の溶菌性酵素、超音波、圧力、凍結等の手段により破碎し、得られた破碎物を慣用の精製法(例えば、塩析、カラムクロマトグラフィー、有機溶媒抽出等)により精製すること、

(II) 前記馴化培地を慣用の精製法(例えば、塩析、カラムクロマトグラフィー、有機

50

溶媒抽出等)により精製すること、  
等により得られる。

【0082】

前記キク科植物としては、アーティチョーク、防虫菊等が挙げられる。また、ショウガ科植物としては、月桃等が挙げられる。

【0083】

前記キク科植物又はショウガ科植物由来の害虫忌避成分としては、例えば、前記キク科植物又はショウガ科植物からアルコール抽出、熱水抽出、水蒸気蒸留方法等により抽出された抽出液(すなわち、エタノール抽出物、熱水抽出物、水蒸気蒸留抽出物等)等が挙げられる。具体的には、アーティチョークのエタノール抽出物、アーティチョークの熱水抽出物、月桃のエタノール抽出物、月桃の熱水抽出物、月桃の水蒸気蒸留抽出物等が挙げられる。

10

【0084】

本発明の防除剤中の前記a)～c)の有効成分の含有量は、植物病原菌の生育を抑制するに十分な量であればよい。特に限定されないが、例えば、本発明の防除剤中の前記a)～c)の有効成分の量としては、微生物の量として、 $1 \times 10^2$ ～ $1 \times 10^{30}$  cfu、好みしくは、 $1 \times 10^8$ ～ $1 \times 10^{15}$  cfu、より好みしくは、 $1 \times 10^5$ ～ $1 \times 10^{12}$  cfuに相当する量等が挙げられる。また、使用時に、水、培地成分等で希釈して用いるためには、さらに、濃縮されたものであってもよい。

20

【0085】

前記害虫忌避成分をさらに含有した本発明の防除剤中における該害虫忌避成分の含有量は、害虫忌避効果を発揮させるに十分な量であればよい。

【0086】

本発明の防除剤の供給方法としては、例えば、用途に適した濃度で前記a)～c)の有効成分を含有した防除剤、又は用途に適した濃度で前記a)～c)の有効成分と前記害虫忌避成分とを含有した防除剤を、じょうろや噴霧器等を用いて、作物の苗、種子等を植える前の土壤に供給すること、作物の苗、種子等に直接供給すること等が挙げられる。本発明の防除剤を供給した土壤は、土壤病害菌の生育が抑制され、有用微生物の多く存在する環境となり土壤病害の起こりにくい土壤となる。

【0087】

また、本発明の防除剤は、作物の種類及びその生育時期、植物病原菌の種類及びその活動時期、害虫の種類及びその発生時期等に合わせて施用される。

30

【0088】

なお、本発明の防除剤の防除効果の評価は、例えば、

(i) 防除剤の供給による植物病原菌に対する阻止円の形成の有無又は該阻止円の大きさの測定を行なう評価方法、

(ii) 防除剤を塗布した葉等に集まる害虫の有無又は害虫の死虫率の測定を行なう評価方法、

等により行なわれる。ここで、前記(i)の評価方法においては、阻止円を形成することが、該防除剤が、防除効果を有することの指標となり、阻止円の大きさが、防除効果の大きさに比例する。また、前記(ii)の評価方法においては、防除剤を塗布した葉等に害虫が集まらないこと及び害虫が死に至ることが、該防除剤が、防除効果を有することの指標となる。

40

【0089】

本発明の微生物によれば、有害生物の防除方法が提供される。本発明の防除方法は、前記a)～c)からなる群より選ばれた少なくとも1種を、植物又は該植物を生育させるための土壤に供給することを特徴とする方法である。本発明の防除方法においては、キク科植物又はショウガ科植物由来の害虫忌避成分を植物又は該植物を生育させるための土壤にさらに供給してもよい。

【0090】

50

本発明の防除方法において、前記a)～c)の供給量及び前記害虫忌避成分の供給量は、植物の種類、植物への供給箇所の大きさ、植物を生育させるための土壤の面積、防除対象の微生物の種類、防除対象の害虫の種類等により適宜設定することができます。前記a)～c)の供給量は、例えば、ほうれん草株腐れ病病原菌に対しては、土壤  $1\text{ m}^3$ あたり、微生物の量として、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{1.5}$  c f u、好ましくは、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{1.2}$  c f uとなる量であればよく、他の病原菌に対しても同様の量であればよい。また、前記害虫忌避成分の供給量は、前記害虫忌避成分を防除剤 1 L 中 2.5% (乾燥重量) 含有する場合、水により、500～10,000倍の濃度とし、防除効果を発揮しうる量となるように、土壤又は植物に撒布すればよい。

## 【0041】

10

本発明の防除方法において、前記a)～c)と前記害虫忌避成分とは、前記防除剤として、植物又は該植物を生育させるための土壤に供給してもよい。

## 【0042】

植物又は該植物を生育させるための土壤への前記a)～c)と前記害虫忌避成分との供給は、散布、混合、塗布、浸漬等により行なわれうる。具体的には、特に限定されないが、例えば、

一 本発明の微生物の培養液を、作物を栽培する前の土壤に混和、又は噴霧器により土壤に撒布すること、

一 本発明の微生物の馴化培地を、噴霧器により、作物が植えられた土壤又は作物に撒布すること、

一 本発明の微生物の馴化培地を結晶化又は粉末化させて得られた産物を、作物を栽培する前の土壤に混和又は作物が植えられた土壤に撒布すること、

一 本発明の微生物の培養液を、ふすま、もみがら、土壤改良剤に添加し、固定させて得られた産物を、作物を栽培する前の土壤に混和又は該土壤に撒布すること、

一 本発明の微生物の馴化培地と、キク科植物又はショウガ科植物から、エタノール抽出液又は熱水抽出液とを混合して得られた防除剤又は、該馴化培地とエタノール抽出液又は熱水抽出液とのそれぞれを別々に、噴霧器を用いて、害虫の発生しやすい箇所に撒布するが、あるいは、作物又は土壤に撒布すること等が挙げられる。

## 【0043】

30

## 【実施例】

以下、本発明を実施例等により詳細に説明するが、本発明は、かかる実施例等により限定されるものではない。

## 【0044】

## 実施例 1

## (1) 供試試料の調製

株式会社カンサイ倉橋工場内のコンポスト化過程にある堆積物から 1 カ所あたり約 100 kg の堆積物を採取した。採取した堆積物のうち約 1/8 を、滅菌生理食塩水 10 ml とを、26 ml 容の試験管に入れた。得られた混合物を、ホルテックスミキサーで約 5 分間混合し、その後、20 分間室温 (約 25 °C) で放置し、10% 試料含有懸濁液 (供試試料) を得た。得られた供試試料を、植物病原菌に対する阻止円形成試験に供した。

## 【0045】

## (2) 対 試験

植物病原菌として、

a) ほうれん草株腐病の病原菌 [リソクトニア ソラニ ケーン (Rhizoctonia solani kuehn)]

b) ほうれん草萎凋病の病原菌 [フサリウム オキシスプラム エフ. スピーシーズ スピナシエ O-27 株 (Fusarium oxyphrum f. sp. spinaceae O-27)]

c) 果樹紋羽病の病原菌 [ロセリニア ネカトリクス (Rosellinia necatrix)]

40

50

セトックス)】、及び

d) トマト根腐萎洞病の病原菌 [フサリウム オキシスプラム エフ. スピーシーズ ラディシス-リオペルシチ O-84 株 (*Fusarium oxyphrum* f. sp. *Radiciis-lyopersici* O-84)] を用いた。

【0046】

ポテトデキストロース培地 [ニッスイ社製、カタログ番号: 05709 (1リットルあたりの組成: ポテト抽出液粉末 4%、ブドウ糖 20%、寒天粉末 15%)] 8.9 g を、イオン交換水 100ml に溶解し、得られた溶液を 121℃ で 15 分間滅菌した。ついで、得られた滅菌培地 20ml を、滅菌シャーレに入れ、固化させ、試験用培地を得た。

10

【0047】

各植物病原菌を、前記試験用培地の中心部分に接種した。ついで、播種箇所から等間隔になるように、試験用培地に円形 紙 (直径 8mm、厚手、アドバンテック社製) を四方に配置した。なお、前記円形 紙は、使用前に、121℃ で 15 分間処理することにより滅菌された 紙である。

【0048】

前記 (1) で得られた供試試料 100μl を、試験用培地の円形 紙上に滴下した。

【0049】

ついで、各試験用培地を、30℃ の恒温室内で、約 1 ~ 2 週間インキュベートした。その後、各試験用培地上の阻止円を観察した。阻止円を形成した供試試料について、画線塗抹培養を繰返し行なうことにより、菌を純粋化した。

20

【0050】

ついで、純粋化された菌を用いて、対 試験を行なった。明確な阻止円の形成を、植物病原菌の生育抑制能を有する菌であるとの指標とした。その結果、A-8、A-7 及び A-19 が得られた。

【0051】

(3) 微生物学的性質の検討

得られた A-8、A-7 及び A-19 のそれぞれについて、微生物学的性質を調べた。各微生物学的性質は、慣用の方法により評価された。その結果を表 1 ~ 4 に示す。

30

【0052】

【表 1】

形態学的性質	A-8	A-7	A-19
細胞の形態	*1 桧菌 (1.0×1.5~2.0μm)	桜菌 (0.7×0.8~2.0μm)	桜菌 (0.8×1.5~2.0μm)
細胞の多形性の有無	*1 -	-	-
運動性 (鞭毛の着生状態)	*1 +(周毛)	+(周毛)	+(周毛)
胞子の有無 (胞子の部位)	*1 +(中央)	+(中央)	+(中央)
色	*1 クリーム色	クリーム色	クリーム色
光沢	*1 -	-	-
色素産生	*1 -	-	-
表面発育の有無	*2 +	+	+
培地の混濁の有無	*2 +	+	+
生育状態	*3 +	+	+
ゼラチン溶化	*3 +	+	+
凝固	*4 -	-	-
色調の変化	*4 -	-	-

40

注) +: 陽性、-: 陰性、w: 反応弱

\*1 Nutrient agar [オキソイド(Oxoid)社製]、30℃

\*2 Nutrient Broth [オキソイド(Oxoid)社製]、30℃

\*3 ゼラチン溶化培養 30℃

\*4 リトマス・ミルク

【0053】

50

【表2】

生理学的性質		A-3	A-7	A-19
グラム染色性	不定	+	+	+
硝酸塩の還元	+	-	-	+
脱塩反応	弱	-	-	-
MRテスト	+	+	+	+
VPテスト	-	+	+	+
インドール産生	-	-	-	-
硫化水素の生成	+	-	-	-
デンプンの加水分解	-	+	+	+
クエン酸の利用	Koser	-	-	-
	Christensen	+	+	+
無機窒素源の利用	硝酸塩 アノモニアム 有	+	+	+
色素の生成	-	-	-	-
ウレアーゼ活性	-	-	-	-
オキシダーゼ活性	-	-	-	-
カタラーゼ活性	+	+	+	+
生育pH	4.0	+	+	+
	5.5	+	+	+
	8.5	+	+	+
生育温度	30	+	+	+
	37	+	+	+
	45	+	+	+
	50	+	+	+
生育条件(好気性、嫌気性)	好気	好気	好気	好気
O-Fテスト	-	-	-	-

10

20

【0054】

【表3】

糖類からの酸産生/ガス産生	A-3	A-7	A-19
L-アラビトース	+/ -	+/ -	+/ -
D-グルコース	+/ -	+/ -	+/ -
D-フラクトース	+/ -	+/ -	+/ -
マルトース	+/ -	+/ -	+/ -
ラクトース	-/ -	+/ -	+/ -
D-ソルビトール	+/ -	+/ -	+/ -
イノシトール	+/ -	+/ -	+/ -
デンプン	+/ -	+/ -	+/ -
D-キシロース	+/ -	-/ -	+/ -
D-マンノース	+/ -	+/ -	+/ -
D-ガラクトース	+/ -	-/ -	-/ -
スクロース	+/ -	+/ -	+/ -
トレハロース	+/ -	+/ -	+/ -
D-マンニトール	+/ -	+/ -	+/ -
グリセリン	+/ -	+/ -	+/ -

80

+ : 陽性、- : 陰性、w : 反応弱

【0055】

【表4】

40

その他の生理学的性質	A-3	A-7	A-19
β-ガラクトシダーゼ活性	-	-	-
アルギニンジヒドロラーゼ活性	-	-	-
リジンデカルボキシラーゼ活性	-	-	-
トリプトファンデアミナーゼ活性	-	-	-
ゼラチナーゼ活性	+	+	+
カゼインの加水分解性	+	+	+
レシチナーゼ活性	+	+	+
10% (w/v) NaCl 存在下での生育性	+	+	+

50

+ : 陽性、- : 陰性、w : 反応弱

## 【0056】

前記表1～4に示される微生物学的性質及び16S rDNAの塩基配列の解析結果から、前記A-3、A-7及びA-19は、バチルス(*Bacillus*)属に属する細菌であることが示唆された。

## 【0057】

なお、前記A-3、A-7及びA-19は、それぞれ、*Bacillus* sp. A-3、*Bacillus* sp. A-7及び*Bacillus* sp. A-19と命名・表示され、寄託日：2002年12月26日、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター〔日本国茨城県つくば市東1-1-1 中央第6(郵便番号305-8566)〕に、FERM P-19178、FERM P-19179及びFERM P-19180として寄託されている。

## 【0058】

## 実施例2

実施例1で得られたA-3、A-7及びA-19を、それぞれ、前記ポテトデキストロース培地に、1白金耳播種し、30℃で24時間、240rpmで振 培養した。

## 【0059】

## 試験例1 円形 紙法

前記防除剤による各種微生物の生育に対する抑制効果を、前記実施例2で得られた各馴化培地による該微生物の生育に対する阻止円の形成及び該阻止円の大きさを測定することにより評価した。

20

## 【0060】

微生物としては、前記a)～d)の植物病原菌、酵母等を用いた。各微生物を、それぞれの培養に適した培地を用い、十分に生育するまで培養し、各微生物の培養物を得た。

## 【0061】

ポテトデキストロース培地〔ニッスイ社製、カタログ番号：05709(1リットルあたりの組成：ポテト抽出液粉末 4%、ブドウ糖 20%、寒天粉末 15%)〕8.9%を、イオン交換水 100mlに溶解し、得られた溶液を121℃で15分間滅菌した。ついで、得られた滅菌培地 20mlを、滅菌シャーレに入れ、固化させ、試験用培地を得た。

## 【0062】

ついで、得られた試験用培地上の中心部分に、5mm×5mm角で各種微生物を播種した。また、播種箇所から等間隔(2cm)になるように、試験用培地に121℃で15分間滅菌した円形 紙(直径8mm、アドバンテック社製、商品名：定性 紙、厚手)を四方に配置し、該円形 紙上に、実施例2で得られた培養液 100μlを滴下した。

30

## 【0063】

ついで、各試験用培地を、30℃の恒温室内で、前記a)及びc)については、約1週間インキュベートし、前記b)及びd)については、約2週間インキュベートした。その後、各試験用培地上の阻止円の形成を観察した。その結果を表5に示す。

## 【0064】

## 【表5】

40

植物病原菌名	阻止円(直径mm)		
	A-3	A-7	A-19
① <i>Aspergillus flavus</i> Link Fries f. glaber	33	30	50
② <i>Aspergillus flavus</i> Link Fries var. oryzae	30	30	35
③ <i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	37	26	36
④ <i>Mucor hiemalis</i> Wehmeyer f. hiemalis	35	38	38
⑤ <i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	30	25	28
⑥ <i>Phizopus oryzae</i> Went & Prinsen Geerlings	28	15	33
⑦ <i>Candida albicans</i> (Robin) Berkhort	20	13	18
⑧ <i>Cryptococcus neoformans</i> (Sanfelice) Vuillemin	12	10	12
⑨ <i>Pichia membranifaciens</i> (E.C.Hansen) E.C.Hansen	30	13	33
⑩ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Meyer ex E.C.Hansen	13	13	20
⑪ <i>Rhizoctonia solani</i> kühn O-28	40	30	30
⑫ <i>Rosellinia necatrix</i>	30	24	26
⑬ <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. spnaciae stain O-27	28	35	30
⑭ <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. Radicis-lycopersici O-34	30	30	30

10

## 【0065】

その結果、表5に示すように、各種微生物に対して、明確な阻止円を形成することがわかった。すなわち、実施例1で得られた各細菌は、防除剤として有用であることが示された。また、実施例1で得られた各細菌は、複数の植物病原菌、植物病原菌等の生育を抑制し、さらには、酵母の生育の抑制能を有することが示され、特に、A-8は、黄色色素を產生したため、新規菌株であることが示唆された。

20

## 【0066】

## 実施例8

月桃(葉2kg/エタノール18L、茎3.78kg/エタノール10L)又はアーティチョーク(葉4.8kg/エタノール200ml)を、ロータリーエバポレーターを用いて濃縮し、エタノール抽出液[月桃 約20mg(月桃抽出物乾燥重量)/ml、アーティチョーク 約100mg(アーティチョーク抽出物乾燥重量)/ml]を得た。ついで、前記エタノール抽出液と、実施例2で得られた馴化培地とを混合し、エタノール抽出液の最終濃度が、1体積%、10体積%又は50体積%である被検試料を得た。

## 【0067】

ここで、なお、月桃のエタノール抽出液から得られた1体積%-被検試料、10体積%-被検試料及び50体積%-被検試料のそれぞれに含まれる抽出物は、乾燥重量として、それぞれ、約0.98mg、約9.8mg及び約46.5mgである。また、アーティチョークのエタノール抽出液から得られた1体積%-被検試料、10体積%-被検試料及び50体積%-被検試料のそれぞれに含まれる抽出物は、乾燥重量として、それぞれ、約4.65mg、約46.5mg、約232.5mgである。

30

## 【0068】

また、月桃(葉1kg/イオン交換水4L、茎1kg/イオン交換水1L)又はアーティチョーク(葉100g/イオン交換水300ml)を沸騰水中で1時間煮沸し、ロータリーエバポレーター等により、熱水抽出液[100mg(抽出物乾燥重量)/ml]を得た。ついで、前記熱水抽出液と、実施例2で得られた馴化培地とを混合し、熱水抽出液の最終濃度が、1体積%、10体積%又は50体積%である被検試料を得た1体積%-被検試料、10体積%-被検試料及び50体積%-被検試料のそれぞれに含まれる抽出物は、乾燥重量として、それぞれ、約4.65mg、約46.5mg、約232.5mgである。

40

## 【0069】

## 試験例2

## (1) 供試昆虫の調製

供試昆虫として、コナガと、エンドウヒケナガアブラムシとを用いた。

## 【0070】

コナガ及びエンドウヒケナガアブラムシともに、25±3℃、明条件16時間-暗条件8

50

時間の条件下、インキュベーター内で飼育した。

【0071】

エンドウヒゲナガアブラムシについては、以下のようにして得られた虫体を用いた。ソラマメの芽出し（発芽から約4日～1週間）の茎部分（豆の直上部分）に、産業用ワイヤー〔商品名：キムワイヤ（登録商標）（十条キンバリー株式会社製）〕約1cm×1.5cmを巻きつけた。ついで、ワイヤーを巻き付けた茎を、試験管（外径25mm、長さ150mm）に入れた。かかる試験管に、成虫数匹を入れ、産子させ、1～2齢の幼虫を得た。また、同様に、成虫に産子させ、該成虫を除去した後、幼虫を生育して、成虫を得た。得られた1～2齢の幼虫と成虫とを、以下の試験に用いた。

【0072】

10

また、コナガについては、カイワレ大根と人工飼料（ニッテク薬品工業（株）社製、商品名：インセクタコナガー0128）とを併用して累代飼育した個体群の脱皮直後の4齢幼虫を用いた。

【0073】

（2）エンドウヒゲナガアブラムシに対する忌避効果の評価

有害生物の代表例として、エンドウヒゲナガアブラムシを用い、実施例8で得られた被検試料による該エンドウヒゲナガアブラムシに対する忌避効果を評価した。

【0074】

ソラマメの芽出しの上部を、前記被検試料に1分間浸漬させ、その後、風乾した。ついで、ソラマメの芽出しと幼虫をカップに入れた。その後、カップに幼虫を入れた時点から開始して、24時間毎に、観察し、1～2齢の幼虫及び6～7齢の成虫が、芽出しに寄りつくかどうかを指標として、忌避効果を評価した。なお、対照として、前記被検試料のかわりに、エタノール又は水に浸漬させたソラマメの芽出しを用いた。

20

【0075】

その結果、対照であるエタノール又は水に浸漬させたソラマメの芽出しには、エンドウヒゲナガアブラムシが寄ってきだが、A-8、A-7及びA-19のそれぞれから得られた各被検試料に浸漬させたソラマメのいずれにも寄りつかなかった。したがって、A-8、A-7及びA-19は、エンドウヒゲナガアブラムシを忌避する性質を有することがわかった。

【0076】

30

（3）コナガに対する忌避効果の評価

有害生物の一例として、コナガを用い、実施例8で得られた被検試料による該コナガに対する忌避効果を評価した。

【0077】

忌避効果の評価には、キャベツの苗片（直径2cm）の両面に、前記被検試料20μlを塗布し、風乾させ、得られた処理苗片を用いた。前記処理苗片を、直径6cm、高さ2.8cmのカップ内に入れ、コナガ4齢幼虫を1カップあたり1匹を該カップにさらに入れた。24時間毎にコナガがなるまでの期間観察し、接触後の死虫率を調べた。なお、対照として、前記被検試料のかわりに、エタノール又は水で処理した対照苗片を用いた。また、処理苗片及び対照苗片を、24時間毎に交換した。結果を表6～9に示す。

40

【0078】

【表6】

エタノール抽出液含有濃度 (v/v%)		1	10	50
死虫率 (%)	乾燥重量 ( $\mu\text{g}$ )	0.93	9.3	46.5
	月桃-葉	5	50	80
	月桃-茎	5	60	90
対照		0	0	0

【0079】

【表7】

10

熱水抽出液含有濃度 (v/v%)		1	10	50
死虫率 (%)	乾燥重量 ( $\mu\text{g}$ )	4.65	46.5	232.5
	月桃-葉	3	30	60
	月桃-茎	3	35	65
対照		0	0	0

【0080】

【表8】

20

エタノール抽出液含有濃度 (v/v%)		1	10	50
死虫率 (%)	乾燥重量 ( $\mu\text{g}$ )	4.65	46.5	232.5
	アーティチョーク-葉	5	20	50
	対照	0	0	0

【0081】

【表9】

80

熱水抽出液含有濃度 (v/v%)		1	10	50
死虫率 (%)	乾燥重量 ( $\mu\text{g}$ )	4.65	46.5	232.5
	アーティチョーク-葉	2	18	40
	対照	0	0	0

【0082】

その結果、対照であるエタノール又は水で処理した対照苗片には、コナガが寄ってきたり、月桃及びアーティチョークのそれぞれから得られた各被検試料で処理した処理苗片のいずれにも寄りつかなかった。したがって、月桃及びアーティチョークは、コナガを忌避する性質を有することがわかった。

40

【0083】

試験例3

有害生物の代表例として、エンドウヒゲナガアブラムシ1~2齢幼虫を用い、前記実施例8で得られた被検試料に対する該エンドウヒゲナガアブラムシの薬剤感受性を評価した。

【0084】

ガラス管(直径8mm×高さ40mm)の一端を、LABORATORY FILM(商品名:パラフィルム)で覆った。被検試料と人工飼料(組成を表10に示す)との混合物20μlを、前記ガラス管上のパラフィルム部分に滴下し、その上を薄く伸張したパラ

50

フィルムで覆った。得られたものを、被検試料の有効量の評価のための餌として用いた。

【0085】

【表10】

		mg			mg
アミノ酸	L-アラニン	100	ビタミン類	p-アミノ安息香酸	10
	L-アルギニン	400		アスコルビン酸	100
	L-アスパラギン	300		ビオチン	0.1
	L-アスパラギン酸	100		パントテン酸カルシウム	5
	L-システイン(塩酸塩)	50		コリンクロリド	50
	L-シスチン	5		葉酸	1
	γ-アミノブチリン酸	20		イノシット	50
	L-グルタミン酸	200		ニコチニン酸	10
	L-グルタミン	600		ビリドキシン	2.5
	グリシン	20		リボフラビン	5
	L-ヒスチジン	200		チアミン	2.5
	DL-ホモセリン	800		クエン酸カルシウム	10
	L-イソロイシン	200		コレステロールベンゾアート	25
	L-ロイシン	200		リン酸一カリウム	250
	L-リジン(塩酸塩)	200		塩化マグネシウム	200
	L-メチオニン	100		シーカロース	35000
	L-フェニルアラニン	100		塩化第二銅	0.254
	L-プロリン	100		塩化第二鉄	1.336
	L-セリン	100		塩化マンガン	0.504
	L-スレオニン	200		塩化ナトリウム	1.271
	L-トリプトファン	100		塩化亜鉛	0.417
	L-チロシン	20			
	L-バリン	200			

10

20

80

KOH で pH 7.5 に調整

水により全量 100mL とする

【0086】

前記餌に、円筒状に加工したゼラチンカプセル（和光純薬工業株式会社製、商品名：ゼラチンカプセルNo. 00を加工し使用した）をかぶせた。前記カプセル内に、エンドウヒゲナガアブラムシを入れ、コース（8cm × 8cm 角）とプラスチックチューブ（内径 8mm、外径 11mm、高さ 8mm）とで蓋をし、飼育瓶を得た。対照として、エタノール又は水と前記人工飼料との混合物 20μl を用いた。

【0087】

エンドウヒゲナガアブラムシを入れた後、1つの飼育瓶の中に 1 ~ 2 齢幼虫を 3 匹ずつ入れ、28 ± 3℃ の条件下、24時間毎に、脱皮数及び死虫数を観察し、評価を行なった。結果を表11～表14に示す。

40

【0088】

【表11】

		1日後			2日後			3日後		
エタノール抽出液含有濃度 (v/v%)		1	10	50	1	10	50	1	10	50
死虫率 (%)	乾燥重量 ( $\mu\text{g}$ )	0.93	9.3	46.5	0.93	9.3	46.5	0.93	9.3	46.5
	月桃-葉	0	0	33	0	33	67	33	67	100
	月桃-茎	0	33	67	33	33	67	33	100	100
対照		0	0	0	0	33	33	0	67	100

【0089】

【表12】

10

		1日後			2日後			3日後		
熱水抽出液含有濃度 (v/v%)		1	10	50	1	10	50	1	10	50
死虫率 (%)	乾燥重量 ( $\mu\text{g}$ )	4.65	46.5	232.5	4.65	46.5	232.5	4.65	46.5	232.5
	月桃-葉	0	0	33	0	33	67	33	100	100
	月桃-茎	0	0	0	0	67	67	33	67	100
対照		0	0	0	0	0	0	0	0	0

【0090】

【表18】

20

		1日後			2日後			3日後		
エタノール抽出液含有濃度 (v/v%)		1	10	50	1	10	50	1	10	50
死虫率 (%)	乾燥重量 ( $\mu\text{g}$ )	4.65	46.5	232.5	4.65	46.5	232.5	4.65	46.5	232.5
	アーティチョーク-葉	0	0	33	0	33	100	33	67	100
	対照	0	0	0	0	0	33	0	67	100

【0091】

【表14】

30

		1日後			2日後			3日後		
熱水抽出液含有濃度 (v/v%)		1	10	50	1	10	50	1	10	50
死虫率 (%)	乾燥重量 ( $\mu\text{g}$ )	4.65	46.5	232.5	4.65	46.5	232.5	4.65	46.5	232.5
	アーティチョーク-葉	0	0	33	0	33	67	33	67	100
	対照	0	0	0	0	0	0	0	0	0

【0092】

その結果、表11及び表12に示されるように、エンドウヒゲナガアブラムシは、月桃の茎のエタノール抽出液の含有量が10体積%である被検試料に対し、1日目で、33%の死虫率という高い感受性を示した。また、表18及び表14に示されるように、エンドウヒゲナガアブラムシは、アーティチョーク-株のエタノール抽出液又は熱水抽出液の含有量が50体積%である被検試料に対し、1日目で、33%の死虫率という高い感受性を示した。

40

【0093】

実施例4

実施例2と同様に、A-8、A-7又はA-19を培養し、得られた培養液を含有した防除剤( $1 \times 10^2$  ~  $1 \times 10^{3.0}$  c.f.u相当量)を調製する。

【0094】

得られた防除剤を、作物を栽培する前の土壤に混和、又は噴霧器により土壤に散布する。その結果、土壤の環境を、植物病害に強い土壤に改良できる。

50

## 【0095】

## 実施例5

実施例2と同様に、A-3、A-7又はA-19を培養し、得られた培養液から菌体を除去し、得られた馴化培地( $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{3.0}$  c.f.u相当量)を含有した防除剤を調製する。

## 【0096】

得られた防除剤を、噴霧器により、作物が植えられた土壤又は作物に散布する。その結果、作物の病害を防ぐことができる。

## 【0097】

## 実施例6

10

実施例2と同様に、A-3、A-7又はA-19を培養し、得られた培養液から菌体を除去し、得られた馴化培地( $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{3.0}$  c.f.u相当量)を結晶化又は粉末化させ、防除剤を調製する。

## 【0098】

得られた防除剤を、作物を栽培する前の土壤に混和又は作物が植えられた土壤に散布する。その結果、作物の病害を防ぐことができる。

## 【0099】

## 実施例7

20

実施例2と同様に、A-3、A-7又はA-19を培養し、得られた培養液( $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{3.0}$  c.f.u相当量)を、ふすまやもみがら、土壤改良剤に添加し、固定させる。得られた産物を、作物を栽培する前の土壤に混和又は該土壤に散布する。その結果、植物病害を防ぐことができる。

## 【0100】

## 実施例8

実施例2と同様に、A-3、A-7又はA-19を培養し、得られた培養液から菌体を除去し、馴化培地を得る。また、実施例8と同様に、キク科植物又はショウガ科植物から、エタノール抽出液又は熱水抽出液を調製する。ついで、馴化培地と、エタノール抽出液又は熱水抽出液とを含有した防除剤を調製する。

## 【0101】

得られた防除剤を、噴霧器を用いて、害虫の発生しやすい箇所に散布するか、あるいは、作物又は土壤に散布する。その結果、害虫忌避効果が得られ、かつ植物病害を防ぐことができる。

30

## 【0102】

## 【発明の効果】

本発明の微生物によれば、種々の植物病原菌を防除することができ、植物病原菌の生育を抑制し、土壤病害を生じにくい土壤に改良することができ、種々の土壤病害を防除することができるという優れた効果を奏する。また、本発明の防除剤によれば、土壤等への供給、肥料等への供給、植物の根部への供給等の簡便な手法により種々の病害等を防ぐことができ、広範囲の植物病原菌に対して抗菌活性を発揮し、かつ害虫を忌避することができ、土壤病害を生じにくい土壤に改良することができるという優れた効果を奏する。さらに、本発明の防除方法によれば、土壤等への供給、肥料等への供給、植物の根部への供給等の簡便な手法により種々の病害等を防ぐことができ、広範囲の植物病原菌に対して抗菌活性を発揮し、かつ害虫を忌避することができ、土壤病害を生じにくい土壤に改良することができるという優れた効果を奏する。

40

## 【0103】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

〈110〉 KANSAI Co, Ltd.

〈120〉 A microorganism having an ability to aboid noxious organisms, and a preventive agent against noxious organisms comprising thereof.

10

〈130〉 M-14-018

〈160〉 3

〈170〉 PatentIn version 3.1

〈210〉 1

20

〈211〉 1545

〈212〉 DNA

〈213〉 *Bacillus* sp. A-3

〈400〉 1

tggagagttt gatccctggct caggacgaac gctggcgccg tgcctaaatc atgcaagtcg 60

agcggacaga tgggagcttg ctccctgtat ttagccgcgg acgggtgagt aacacgtggg 120

30

taaccctgcct gtaagactgg gataactccg ggaaaccggg gcttaataccg gatggttgtc 180

tgaaccgcac ggttccagaca taaaagggtgg cttaggcgtac cactttacaga tggacccgcg 240

gcmcattagc tagttggtga ggttaacggct caccaaggcg acgatgcgtt gccgaccgttga 300

gagggtgtatc ggcccacactg ggacttgagac acggcccgaga ctccctacggg aggcagcagt 360

agggaatctt ccgcaatggc cgaaagtcgt acggagcaac gccgcgtgag tggatgaagggt 420

tttcggatcg taaagctctg ttgttaggga agaacaagtgc ccgttcaaattt agggcggcac 480

cttgcacggta ccttaaccaga aagccacggc taactacgtt ccagcagccg cggttaatacg 540

40

taggtggcaa gcgttgcgttccg gaattatttgg gcgttaaaggcg ctcgcaggcg gtttttttaag 600

tctgtatgtga aagccccgg ctcaaccggg gagggtcatt gaaaaactggg gaacttgagt 660  
gcagaagagg agagtgaaat tccacgtgt a cgggtaaaat gcgttagat gggggaaac 720  
accagtggcg aaggcgactc tctggtctgt aactgacgct gaggagcgaa agcgtgggaa 780  
gcgaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac gatgagtgct aagtgtttagg 840  
gggtttccgc cccitagtgc tgcagctaac gcattaaagca ctcgcctgg ggagtacggt 900  
cgcaagactg aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgg acatgtggtt 960  
taattcgaag caacgcgaag aaccttacca ggcttgaca tcccttgaca atccttagaga 1020  
taggacgccc cttcggggg cagagtgaca ggtggtgcat gtttgcgtc agtcgtgtc 1080  
gtgagatgtt gggtaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt gatcttagtt gccagcattc 1140  
agtggcac tctaaggtga ctggcggtga caaaccggag gaagggggg atgacgtcaa 1200  
atcatcatgc cccitatgac ctgggctaca cacgtgtac aatggacaga acaaaggcga 1260  
gcgaaaccgc gaggtaagc caatcccaca aatctttct cagttcgat cgcagtctgc 1320  
aactcgactg cgtgaagctg gaatcgctag taatcgccga tcagcatgcc gcggtaata 1380  
cgttcccggtt cttgtacac accgccccgtc acaccacgag agtttgtaac accccaaatc 1440  
ggtgaggtaa cttttatgga gccagccgcc gaagggtggg a cagatgattt gggtaagtc 1500  
gttacaacatgtt agccgtatcg gaagggtggg yttggatcacc tccctt 1545

(210) 2

(211) 1545

(212) DNA

(213) *Bacillus* sp. A-7

30

(400) 2

tgtagatgtt gatccctggct caggacgaac gctggcgccg tgcctaatac atgcaagtgc 60  
agcggacaga tggagcttg ctccctgatg ttagcggcgg acgggtgagt aacacgtggg 120  
taacctgcct gtaagactgg gataactccg ggaaaccggg gctaataccg gatgcttgtt 180  
tgaaccgcatt gtttcagaca taaaaggtgg cttcggctac cacttacaga tggaccgcg 240  
gcgcatttagc tagtgttgc ggttaacggctt caccaaaggcg acgtatgcgtt gcccacactga 300

gagggatgc ggccacactg ggactgagac acggccaga ctctacggg aggcaagg 360  
 agggaatctt ccgcaatgga cggaaatctg acggagcaac gcccgtgag tggatgaagg 420  
 ttgcggatcg taaagctctg ttgttaggaa agaacaatgtt ccgttcaaat aggccggcac 480  
 ctgtacggta cctaacccaga aagccacggc taactacgtg ccaggcggcg cggtaatacg 540  
 taggtggcaa gcgttgtccg gaattatgg gcgttaaaggc ctgcaggcg gtttcttaag 600  
 tctgtatgtt aagccccgg ctcaaccggg gagggttattt gggaaactggg gaacttgagt 660  
 gcagaagagg agagtggaaat tccacgttta gcggttataat gcttagagat gggagggaaac 720 10  
 accagtggcg aaggcgactc tctggtctgt aactgtacgtt gaggagcgaa agcgtgggaa 780  
 gcgaacacgaa ttatgtatccc tggtagtcca cggcgtaaac gatgtatgtt aagtgtttagg 840  
 gggtttccgc ccctttagtgc tgcagctaac gcatatggca ctccgcctgg ggagtacgg 900  
 cgcaagactg aaacttcaagaa gaatttgcgg gggccgcac aagcgttggaa gcatgtggtt 960  
 taatttgcggaa caacgcggaa aaccttacca ggttcttgcata tcccttgcata atcctatggaa 1020  
 taggacgttcc ctttccgggg cagatgttaca ggttgggtt ggttgcgtt acgttgcgtt 1080  
 gttagatgtt gggtaatgtt ccgttacggc cggcaaccctt gatctttagtt gcccggatcc 1140  
 agttgggcac tctttaggttga ctggcggttga caaaccggag gaagggtgggg atgtatgttca 1200  
 atcatcatgttcc cctttagtgc ctgggttaca cacgttgcata aatgggttaca acaaagggttca 1260  
 gcraaaccgc gaggtaatgtt caatcccaca aatcttgc tttttttttt cttttttttt 1320  
 aacttgcactg cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt 1380  
 cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt 1440  
 ggttaggtttaa cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt 1500  
 gtaacaagggtt aatgttgcgtt gttttttttt gttttttttt gttttttttt 1545 80  
 gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt gttttttttt 1545

〈210〉 3

〈211〉 1545

〈212〉 DNA

〈213〉 *Bacillus* sp. A-19

40

〈400〉 3

tggagagttt gatccctggct caggacgaac gctggcgcg tgcctaaatac atgcaagtgc 60  
 agcggacaga tgggagcttg ctcccgtatg ttagccggcgg acgggtgagt aacacgtggg 120  
 taacctcgct gtaagactgg gataaaccccg ggaaaccggg gctaataccg gatggttgtc 180  
 tgaaccgcac gtttacagaca taaaaggggg ctgcggctac cacttacaga tggaccgcg 240  
 ggcatttgc tagttggtga ggttaacggct caccaggcg acgatgcgtia gcccacgtga 300  
 gaggggtgatc ggccacactg ggacigagac acggcccaaga ctccctacggg aggcacgt 360  
 agggaaatctt ccgcaatggc cggaaatctg acggagcaac gcccgcgtgatgatgaaggt 420 10  
 ttccggatcg taaagctctg ttgttaggga agaacaagtgc ccttccaaat agggcggcac 480  
 ctgtacggta cctaaaccaga aagccacggc taactacgtg ccagcagccg cggttaatacg 540  
 taggtggcaa gcgttgtccg gaattattgg ecgttaaaggg ctgcggccg gtttcttaag 600  
 tctgtatgtga aagccccgg ctcaaccggg gagggtcatt gggaaactggg gaacttgagt 660  
 gcagaagagg agagtgaaat tccacgtgtc ggggtgaaat gcgttagagat gggaggaaac 720  
 accagggcg aaggcgactc tctggctctg aactgtacgti gaggagcgaa agcgtgggaa 780  
 gcgaacagga ttagataccc tggtagtcca cggcgtaaac gatgagtgc aagtgtttagg 840 20  
 gggtttccgc cccttagtgc tgcagctaac gcattaaagca ctccgcctgg ggagtacgg 900  
 cgcaagactg aaactcaaag gaatttgcggg gggccgcac aagcggtggc gcatgtggtt 960  
 taattcgaag caacgcgaag aacccatcca ggtcttgaca tcccttgaca aicctagaga 1020  
 taggacgtcc ctccggggg cagagtgtaca ggtgggtgc ggttgcgtc agctcggtc 1080  
 gtgagatgtt gggtaatgc cgcacacgag cgcacccctt gatcttagtt gcccggattc 1140  
 agttgggcac tctaaagggtga ctgcgggtga caaaccggag gaagggtggg atgacgtcaa 1200  
 atcatcatgc cccttatgac ctgggttaca cacgtgtac aatggacaga acaaaggca 1260  
 gcgaaaccgc gaggtaatgc caatcccaca aatctgttct cagttcggt cgcagtcgtc 1320  
 aactcgactg cgttaatgc gaaatcgctag taatcgccga tcagcatgcc ggggtgaata 1380  
 ctgtcccgcc ctgttgcac acgcggccgtc acaccacgag agtttgcgtaa acccgaaatc 1440  
 ggtgaggtaa ctttatggc gccagccgccc gaagggtggg cagatgttgc ggggtgaatc 1500  
 gtaacaagggtt agccgtatcg gaagggtgcgg ytggatcacc tcctt 1545

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

テー マコード (参考)

C12N 1/20

A

C12N 1/20

E